



IFW

P/741-178

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Chin-Tarng LIN et al.

Date: July 1, 2004

Serial No.: 10/797,822

Group Art Unit: 1635

Filed: March 9, 2004

Examiner: --

For: NUCLEOLIN ANTISENSE SEQUENCE FOR INHIBITION OF CANCER CELL
PROLIFERATION

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Arlington, V 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Sir:

In accordance with 35 U.S.C. §119, Applicants confirm the prior request for priority under the International Convention and submits herewith the following document in support of the claim:

Certified Chinese Application No.

092120792, filed July 30, 2003

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Arlington, VA 22313-1450, on July 1, 2004:

Robert C. Faber

Name of applicant, assignee or
Registered Representative

Signature

July 1, 2004

Date of Signature

RCF:mjb

Respectfully submitted,

Robert C. Faber

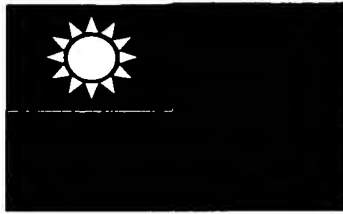
Registration No.: 24,322

OSTROLENK, FABER, GERB & SOFFEN, LLP

1180 Avenue of the Americas

New York, New York 10036-8403

Telephone: (212) 382-0700



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder：

申請日：西元 2003 年 07 月 30 日
Application Date

申請案號：092120792
Application No.

申請人：林欽塘
Applicant(s)

局長
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2004 年 1 月 27 日
Issue Date

發文字號：09320064920
Serial No.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：

※申請日期：

※IPC 分類：

壹、發明名稱：(中文/英文)

抑制癌細胞生長之核仁素反意股

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

林欽塘 / Chin-Tarnng Lin

代表人：(中文/英文)

住居所或營業所地址：(中文/英文)

台北市 106 大安區青田街 7 巷 7 之 1 號 6 樓

國籍：(中文/英文) 中華民國 / ROC

參、發明人：(共 2 人)

姓名：(中文/英文)

1. 林欽塘 / Chin-Tarnng Lin K100479596

2. 吳漢忠 / Han-Chung Wu H121662660

住居所地址：(中文/英文)

1. 台北市 106 大安區青田街 7 巷 7 之 1 號 6 樓

2. 台北市 105 松山區新東街 66 巷 12 號 5 樓

國籍：(中文/英文) 1. 中華民國 / ROC

2. 中華民國 / ROC

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：
【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

伍、中文發明摘要：

本發明係提供一種可抑制癌細胞生長的核仁素反意股。該核仁素反意股係與核仁素特異性的 mRNA 互補，為一 20 核苷酸之核苷酸序列，與核仁素之 mRNA 雜交時可阻止核仁素的合成，並抑制核仁素的表現，進而抑制腫瘤細胞之生長速率。此核仁素反意股不論於活體外(*in vitro*)或活體內(*in vivo*)皆可有效抑制腫瘤細胞中核仁素的表現，並抑制腫瘤細胞生長的速率。此核仁素反意股可供作為開發抑制腫瘤細胞生長的治療藥劑用。

陸、英文發明摘要：

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（四）圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種可抑制癌細胞增殖的基因序列。本發明尤其係關於一種可抑制癌細胞生長的核仁素反意股(antisense)，此反意股可於核仁素合成時，與核仁素之核苷酸序列結合，以達到抑制癌細胞生長之目的。

【先前技術】

對於住在南中國、台灣及新加坡的人來說，鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一種極為常見的癌症。目前尚未清楚這種惡性上皮腫瘤發生的原因及機制；不過，一般認為鼻咽癌和EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)有著密切的關係。

已知，當EB病毒感染宿主細胞後會以兩種途徑存在於細胞核內。一為潛伏性感染(Latent infection)，病毒基因體以環狀態存在核內，並與細胞同步複製；另一途徑為溶裂性感染(Lytic infection)，病毒基因體以滾環(Rolling circle)形式複製。此時大量病毒顆粒被製造，最後造成感染細胞的溶解(Lysis)。一般被感染細胞，包括B淋巴球細胞株及鼻咽癌細胞等，大部份是以潛伏感染狀態存在，只有少數感染之B細胞會因受第六激素(IL-6)刺激或被巴豆毒醇酯(phorbol ester)誘發而進入溶裂性狀態。根據不同的病毒潛伏基因的表現，可將EB病毒潛伏感染分為三型：第一型(latency I)，僅有第一型EBV核蛋白抗原(EBNA-1)

表現而無其他潛伏性病毒蛋白表現，第一類巴克氏淋巴瘤 (Group I BL) 即屬此一型；第二型 (Latency II)，表現第一型 EBV 核蛋白抗原和第一型潛伏性膜蛋白 (Latent membrane protein 1, LMP1) 兩種病毒蛋白，鼻咽癌、霍奇金氏病 (Hodgkin's disease) 及 T 細胞淋巴瘤 (T cell lymphoma) 即屬此型；第三型 (latency III)，所有 9 種潛伏性病毒蛋白質均會表現，在第三類巴克氏淋巴瘤 (group III BL) 和淋巴芽細胞株 (LCL) 可檢測到這些病毒蛋白質。

已有研究結果顯示，受 EB 病毒感染的鼻咽癌細胞較無 EB 病毒感染者長得更快，並且能在免疫不全小鼠身上造成更大的腫瘤團塊；由此可推論 EB 病毒可能對於鼻咽癌細胞增生的情形有強化的效果。當以基因晶片技術分析 EB 病毒對鼻咽癌細胞造成的基因變化時，可發現核仁素 (nucleolin) 在感染 EB 病毒的鼻咽癌細胞比未感染 EB 病毒的鼻咽癌細胞有較高的表現。

鼻咽癌為人類上皮鱗狀細胞的癌症，目前其治療的主要方法為放射線療法 (radiotherapy)、手術移除 (surgical removal) 及化學療法 (chemotherapy)，雖然對初期病患之成效不錯，但仍有 20% 的病人，五年之內仍有再發病的機會，對晚期之治癒例則少於 50%。且上述的治療方法皆具有副作用，並無法達到更高的治癒機率，因此仍有必要開發更有效的輔助性治療技術，以增加鼻咽癌晚期病人存活率，並減少治療期間及治療後的副作用所帶來的不適與痛苦。

利用基因療法來治療人類疾病已從理論基礎進入臨床實驗階段。所以也有許多科學家致力於癌症基因療法的研究，期許為癌症治療尋求新的治療技術，以解決癌症治療上的非專一性的缺點，減少正常細胞死亡所帶來不適的副作用。

核仁素最早係由 Orrick et al. (1973)所提出，其係為分子量大小約 100~110 kDa 的蛋白質，主要存於增生細胞的核仁內。核仁素存在著自動降解(autodegradation)性，並會於西方墨漬分析法中呈現兩個分別約 70 及 50 kDa 的降解帶(band)。核仁素係為高度磷酸化(phosphorylated)及甲基化(methylated)，且亦可被 ADP-核糖苷化(ADP-ribosylated)。由於已知核仁素的合成與細胞分裂的速度呈正相關，因此在腫瘤及其他快速分裂的細胞中具有較高的核仁素量。

由於核仁素表現的程度被認為與細胞增生的速率有關；在分裂快速的惡性腫瘤細胞中，核仁素的表現程度提高，因此可作為腫瘤成長速率的參考指標。由於核仁素在腫瘤增殖上可能扮演一個重要的角色，因此本發明即藉由抑制核仁素的合成，以試圖抑制腫瘤的生成速度。

【發明內容】

本發明之目的係提供一種可與核仁素核苷酸結合並抑制核仁素合成之反意股核苷酸，藉以達到抑制癌細胞生長之目的。

由於從一些相關的報告指出，在許多腫瘤及其他快速分裂的細胞中可發現核仁素的數量有增加的現象，且EB病毒的感染亦可增加核仁素的表現。因此，為確認是否鼻咽癌細胞株或其他癌症細胞株中，確實均呈現向上調節(up-regulated)的核仁素表現。在此，藉由西方墨漬分析法檢測癌症細胞株中的核仁素表現。結果發現，所有的鼻咽癌細胞皆顯現出強的核仁素染色帶(band)及兩降解帶，而基質細胞(stromal cell)則呈現極為微弱的免疫染色，或甚至沒有。因此，可確認癌症細胞之增殖確與核仁素之表現具有絕對之關係，抑制核仁素之表現或許可控制癌症細胞之增生。

為確認此一論點，本發明先根據核仁素核糖核酸(RNA)的特異性股，合成與其互補之反意股硫代磷酸酯寡核苷酸序列(phosphorothioate oligonucleotide，簡稱為S-oligos)。藉由此核仁素反意股 S-oligos 來標記核仁素 mRNA 以阻止其進行轉譯(translation)，進而抑制核仁素的表現。

經以此核仁素反意股 S-oligos 處理腫瘤細胞後，發現僅需較低之核仁素反意股核仁素反意股 S-oligos 的濃度即可成功的抑制腫瘤細胞的生長。此外，經反意股 S-oligos

處理過後之癌細胞亦顯示僅含有非常低的核仁素 mRNA 量及蛋白質表現。

另外，經處理後的腫瘤細胞顯示出明顯的凋亡 (apoptotic) 變化且呈現時間依存性。經 4 天的處理後，86% 的腫瘤細胞會被殺死，且大部分的腫瘤細胞於 2~3 天的處理後皆出現凋亡變化，而控制組 (以同意股 S-oligos 處理組)，則顯現沒有任何的影響於細胞的生長上。此結果強烈支持藉由核仁素反意股抑制核仁素的表現，是於活體外 (*in vitro*) 抑制腫瘤細胞生長之極佳手段。

另外，在活體內 (*in vivo*) 核仁素反意股抑制核仁素的表現可藉由將核仁素反意股 S-oligos 注入長有鼻咽癌異種移植腫瘤的老鼠體內來進行測試。結果發現，腫瘤的生長受到明顯的抑制。

綜上所述，根據本發明所指出之核仁素反意股可有效的抑制核仁素的合成，及其蛋白質的表現，進而抑制腫瘤細胞之生長，藉此提供一種有效的腫瘤治療方法。

本發明將藉由參考下列的實施方式做進一步的說明，這些實施方式並不限制本發明前面所揭示之內容。熟習本發明之技藝者，可做些許之改良與修飾，但仍不脫離本發明之範疇。

【實施方式】

參閱第一圖，為藉由西方墨漬法(Western blotting)分析正常黏膜細胞株與腫瘤細胞株中核仁素之表現情形，以及生物檢體(biopsy specimen)中核仁素之免疫組織化學(immunohistochemical)定位分析之結果。

由第一圖 A 中可以看出，當以西方墨漬法比較核仁素於 5 株正常黏膜細胞株(NNM9, 11, 12, 13 及 14，分別取自國立台灣大學附設醫院)及 13 株鼻咽癌細胞株(NPC-TW01~10, NPC-CGBM-1, NPC-HONE1 及 NPC-CNE-1)之中的表現時，結果顯示在鼻咽癌細胞株的分析結果中，具有明顯的 105kDa 染色帶及核仁素的兩條降解帶(70kDa 及 50kDa)，而在正常細胞中僅顯示微弱的 105kDa 帶及微弱的核仁素兩條降解帶(第一圖 A)。

另外，亦使用其他七種非鼻咽癌之癌症細胞株進一步檢測核仁素蛋白質的表現，包含卵巢(ovarian)癌(SKOV3)、結腸癌(SW620)、口腔癌(SAS, Ca 9-22 及 Ca 1-27)、子宮頸(uterine cervix)癌(CaSki)、肺腺癌(pulmonary adeno-carcinoma) (CL 1-5)、前列腺(prostate)癌細胞株(PC-3)及血癌(leukemia)細胞株(THP-1)。同樣以西方墨漬法進行分析後，於每一個細胞株中(第一圖 B，第 6 至 14 列)皆可看到與鼻咽癌細胞株相似具有明顯的 105kDa 染色帶及核仁素的兩條降解帶(70kDa 及 50kDa)，而控制組的 5 正常細胞株中，僅顯示兩條微弱降解的核仁素帶(第一圖 B，第 1 至 5 列)。

除檢測核仁素於細胞株中的表現外，本發明中亦藉由免疫組織化學定位分析法來檢測核仁素於生物檢體 (biopsy specimen) 中的表現。核仁素於生物檢體中的免疫組織化學定位結果顯示一相似的圖案，抗核仁素 (anti-nucleolin) 反應的產物主要出現於腫瘤細胞的核仁及核質中 (箭頭所指處)，而基質細胞 (stromal cell) 只有於其核仁處有輕微的染色 (第一圖 C)。

此結果顯示，所有測試的癌症細胞株中皆較正常細胞株中，具有顯著較高量之核仁素表現，並且於腫瘤生物檢體中核仁及核質處呈現顯著較高之核仁素量。此一結果強烈的支持，核仁素的表現與腫瘤細胞的增殖相關。

如前所述，核仁素的表現與腫瘤細胞的增殖有關。因此本發明即藉由設計一段與特異性之核仁素 mRNA 互補之反意股，使此反意股得以與核仁素 mRNA 雜交，而阻止其進行轉譯 (translation)，進而抑制腫瘤細胞生長的速率。

為此，本發明中設計核仁素反意股 S-oligos 來標記核仁素 mRNA 以阻止其進行轉譯 (translation)，並設計一同意股 S-oligos 作為控制組。核仁素反意股 S-oligos 係為一 20 個核苷酸序列長度之寡核苷酸序列，即 SEQ ID NO: 1。另外，作為控制組的實驗，亦合成一條同意股 S-oligos，即 SEQ ID NO: 2 (第二圖 A)。

之後，將核仁素同意股及反意股 S-oligos (250 nM) 分別藉由轉染試劑 (Oligofectamine, Life Technologies) 作

為載體進行轉染。經轉染後，再藉由已知的反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)及西方墨漬法測定核仁素 RNA 及蛋白質表現。結果顯示，於反意股 S-oligos 處理的細胞中可觀察到核仁素 mRNA 帶受到抑制(第二圖 B，第 1 列)，而同意股 S-oligos 處理的細胞中則仍清楚的呈現核仁素的 510 bp 帶(第二圖 B，第 2 列)。相似的結果也可在西方墨漬法分析中可以看到，反意股 S-oligos 處理的細胞中呈現非常微弱的 105kDa 帶，及兩個微弱的核仁素降解帶(第二圖 C，第 1 列)，而同意股 S-oligos 處理的細胞中則呈現強的 105kDa 帶及兩明顯的核仁素降解帶(第二圖 C，第 2 列)。

由上述經轉染反意股 S-oligos 的鼻咽癌細胞之分析結果中可以看出，根據本發明所指出之反意股 S-oligos (SEQ ID NO: 1)確實可與核仁素 mRNA 雜交，並有效的抑制核仁素合成，進而抑制腫瘤細胞中核仁素的表現，並且其僅需極低的劑量(250 nM)即可達成此一目的。

於確認根據本發明所指出之反意股 S-oligos (SEQ ID NO: 1)確實可與核仁素 mRNA 雜交後，接下來再藉由進一步的實驗檢測是否此反意股 S-oligos 可於活體外(*in vitro*)抑制腫瘤細胞的生長。

參閱第三圖，為核仁素反意股對於鼻咽癌細胞生長抑制的影響。將核仁素同意股/反意股 S-oligos (250 nM)轉染至鼻咽癌細胞後，於培養 1~4 天期間觀察轉染細胞的型態及細胞數。結果發現，經反意股處理組其細胞數每天以明顯的凋亡(apoptotic)變化而顯著的減少。然而，以同

意股處理的細胞則顯現正常細胞的增殖(第三圖 A)。

另外，再藉由溴化二甲基噻唑二苯四氮唑[3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT]分析檢測經以核仁素同意股/反意股處理後之 NPC-TW01 鼻咽癌細胞及正常鼻黏膜細胞的存活率。結果顯示，經以核仁素反意股處理後，可抑制腫瘤細胞的生長，且為時間依存性(第三圖 B)。然而，正常的鼻黏膜細胞則呈現細胞生長速率僅受到輕微的抑制或完全沒有受到抑制。

此一結果顯示，根據本發明所指出之反意股 S-oligos (SEQ ID NO: 1)確實可於活體外(*in vitro*)抑制腫瘤細胞的生長。為進一步確認根據本發明所指出之反意股 S-oligos (SEQ ID NO: 1)亦可於活體內(*in vivo*)抑制腫瘤細胞的生長。在此先將 NPC-TW01 鼻咽癌細胞植入 SCID 小鼠內，待其生成之腫瘤後，再將核仁素同意股 S-oligos，以靜脈注射(*i.v.*)方式，注入不同老鼠體內，之後觀察腫瘤生長及老鼠體重變化。

從結果中可以看出(第四圖 A)，經以核仁素反意股 S-oligos 處理組，其腫瘤生長會受到抑制。然而，以核仁素同意股 S-oligos 及磷酸鹽緩衝溶液處理組，則觀察不到腫瘤生長的抑制現象。

將前述老鼠於 38 天後犧牲，秤量其腫瘤重量。結果顯示(第四圖 B)，經以核仁素反意股 S-oligos 處理組，較以核仁素同意股 S-oligos 及磷酸鹽緩衝溶液處理組，有顯

著較小之腫瘤重量。

實施例一

核仁素反意股寡核苷酸對核仁素表現的抑制

發明人先根據核仁素 mRNA 之特異片段設計核仁素反意股(SEQ ID NO: 1)，並於 Sigma Genosys 合成。為進行控制組實驗另設計依同意股(SEQ ID NO: 2)。

接著，藉由轉染試劑(Oligofectamine)作為載體，將核仁素同意股及反意股 S-oligos (250 nM)分別進行轉染。進行轉染前，先將 5×10^4 cells/well NPC-TW01 鼻咽癌細胞株及正常鼻黏膜(NNM)細胞培養於 6 孔(well)培養盤中，並使其生長 24 小時。轉染混合液係根據製造商的指示，製備於含有每 250 nM 寡核苷酸 4 μ L 轉染試劑(oligofectamine)之 opti-MEM (Invitrogen)培養基中。之後將轉染混合液加入 6 孔培養盤中，使其每 1 孔的體積為 1 毫升，進行轉染 4 小時。接著，不移除轉染混合液直接加入 10%胎牛血清培養基(fetal calf serum medium)。最後於轉染 48 小時後，再藉由已知的反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)及西方墨漬法測定核仁素 RNA 及蛋白質表現。

結果顯示，於反意股 S-oligos 處理的細胞中可觀察到核仁素 mRNA 帶受到抑制(第二圖 B，第 1 列)，而同意股 S-oligos 處理的細胞中則仍清楚的呈現核仁素的 510 bp 帶(第二圖 B，第 2 列)。相似的結果也可在西方墨漬法分析中可以看到，反意股 S-oligos 處理的細胞中呈現非常微

弱的 105kDa 帶，及兩條微弱的核仁素降解帶(第二圖 C，第 1 列)，而同意股 S-oligos 處理的細胞中則呈現強的 105kDa 帶及兩條明顯的核仁素降解帶(第二圖 C，第 2 列)。

實施例二

以溴化二甲基噻唑二苯四氮唑(MTT)分析反意股 S-oligos 對腫瘤細胞生長的抑制影響

將 4×10^3 腫瘤細胞植入 96 孔培養盤的每個孔中，並使其附著隔夜。之後腫瘤細胞以核仁素反意股 S-oligos 分別處理 12、24 及 48 小時。於處理後，每孔中再加入 100 μ l 之含有 2mg/mL MTT 及 5% FBS 血清之 DMEM，於 37°C 下培養 2.5 小時。將 formazan 催化劑溶解於 DMSO 中。

最後，藉由讀取器於 540 nm 下測定其吸光值 (absorbance)。所得之此吸光值再與由同意股 S-oligos 處理所得之吸光值進行計算，以求得細胞存活率。每一次分析皆進行三重複。

結果顯示，經以核仁素反意股處理後，可抑制腫瘤細胞的生長，且為時間依存性(第三圖 B)。然而，正常的鼻黏膜細胞則呈現細胞生長速率僅受到輕微的抑制或完全沒有受到抑制。

實施例三

於活體內(*in vivo*)反意股 S-oligos 對腫瘤細胞生長之影響

自國立台灣大學附設醫院實驗動物中心取 4~6 週齡

之雌性 SCID 老鼠，於實驗前先使其適應環境 7 天。

將預先培養之 NPC-TW01 鼻咽癌細胞以胰蛋白酶處理後懸浮於不含血清 DMEM 中，以肌肉注射(s.c.)方式(1×10^7 細胞，總體積 0.2 毫升)注入老鼠體內。

於 NPC-TW01 鼻咽癌細胞植入 SCID 小鼠內後，待其生成之腫瘤大小約為 $80 \sim 100 \text{ mm}^2$ 時，再將核仁素同意股/反意股 S-oligos 及磷酸鹽緩衝溶液(PBS)，分別以靜脈注射(i.v.)方式，每兩天一次(10 mg/kg)注入不同老鼠體內。之後觀察腫瘤生長及老鼠體重至 35 天。

從結果中可以看出(第四圖 A)，經以核仁素反意股 S-oligos 處理組，其腫瘤生長會受到抑制。然而，以核仁素同意股 S-oligos 及磷酸鹽緩衝溶液處理組，則觀察不到腫瘤生長的抑制現象。

將前述老鼠於 38 天後犧牲，秤量其腫瘤重量。結果顯示(第四圖 B)，經以核仁素反意股 S-oligos 處理組，較以核仁素同意股 S-oligos 及磷酸鹽緩衝溶液處理組，有顯著較小之腫瘤重量。

【圖式簡單說明】

第一圖 (A)顯示正常黏膜細胞株與鼻咽癌細胞株中核仁素的表現情形之西方墨漬法(Western blot)分析之染色照相圖。

(B)顯示正常之黏膜細胞株與非鼻咽癌之腫瘤細胞株中核仁素的表現情形之西方墨漬法(Western blot)分析之染色照相圖。

(C)鼻咽癌生物檢體(biopsy specimen)中核仁素之免疫組織化學(immunohistochemical)定位分析之顯微照相圖。

第二圖 為核仁素反意股對於 NPC-TW01 鼻咽癌細胞株中核仁素表現的影響。

(A)核仁素反意股 / 同意股硫代磷酸酯(phosphorothioate)寡核苷酸(oligonucleotide)(S-oligos)設計。

(B)S-oligos 經轉染(transfection)48 小時後，藉由 RT-PCR 評價鼻咽癌細胞中核仁素的表現。

(C)S-oligos (250 nM)經轉染(transfection)48 小時後，藉由西方墨漬法評價鼻咽癌細胞中核仁素的表現。

第三圖 為核仁素反意股對於鼻咽癌細胞生長抑制的影響。

(A)鼻咽癌細胞與 250 nM 核仁素反意股或同意股 S-oligos 經轉染 4 小時，並分別培養於含有 250

nM S-oligos 的培養液中 1、2、3 及 4 天。

(B)藉由 MTT 分析核仁素 S-oligos 對於鼻咽癌增殖的影響。

第四圖 將植入腫瘤細胞並生成腫瘤之老鼠，分別以同意股 S-oligos (S)、磷酸鹽緩衝液(PBS)及反意股 S-oligos (AS)進行處理。

(A)植入腫瘤細胞後之腫瘤大小變化情形。

(B)經處理 38 天並將老鼠犧牲後，測量所得之腫瘤大小。

拾、申請專利範圍：

1. 一種具有抑制癌細胞生長能力之核仁素反意股 (nucleolin antisense)，至少包含一核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示，其可與核仁素特異性的訊息核糖核酸 (mRNA) 序列專一性雜交並抑制細胞內核仁素的表現 (expression)。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之核仁素反意股，其中該核仁素反意股具有抑制癌細胞生長的能力。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之核仁素反意股，其中該核仁素反意股能使活體內 (*in vivo*) 之腫瘤體積縮小。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之核仁素反意股，其中該核仁素特異性的訊息核糖核酸 (mRNA) 序列包含該訊息核糖核酸 (mRNA) 進行轉譯 (translation) 的起始部位。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之核仁素反意股，其中該核仁素反意股係為經硫代磷酸酯 (phosphorothioate) 修飾之寡核苷酸序列。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之核仁素反意股，其中該癌細胞包含鼻咽癌、卵巢癌、結腸癌、口腔癌、子宮頸癌、肺腺癌、前列腺癌及血癌之癌細胞。
7. 一種包含具有抑制癌細胞生長能力之核仁素反意股的載體，其中該核仁素反意股之核苷酸序列如 SEQ ID NO：1 所示。
8. 一種醫藥組合物包含如申請專利範圍第 1 項所述之核仁素反意股及一適當之載體 (carrier) 或稀釋劑 (diluent)。

9. 一種抑制癌細胞生長的方法，係藉由使用一核仁素反意股與該癌細胞中核仁素之訊息核糖核酸(mRNA)雜交，使該核仁素之合成受到抑制，進而抑制癌細胞進行複製，其中該核仁素反意股之核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中該癌細胞包含鼻咽癌、卵巢癌、結腸癌、口腔癌、子宮頸癌、肺腺癌、前列腺癌及血癌之癌細胞。

序列表

<110>林欽塘

<120>一種可抑制癌細胞生長的核仁素反意股

<160>2

<210>1

<211>20

<212>RNA

<213>人工序列

<220>

<223>可與核仁素特異性 mRNA 專一性結合之核仁素反意股

<400>1

ATGAT GGCGG CGGAG TGTGA 20

<210>2

<211>20

<212> RNA

<213>人工序列

<220>

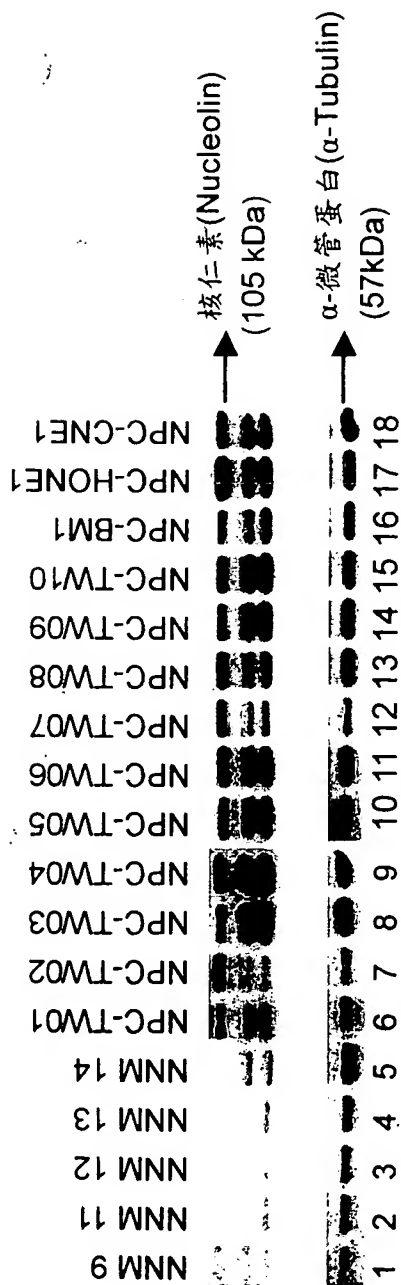
<223>與核仁素特異性 mRNA 序列一致之核仁素同意股

<400>2

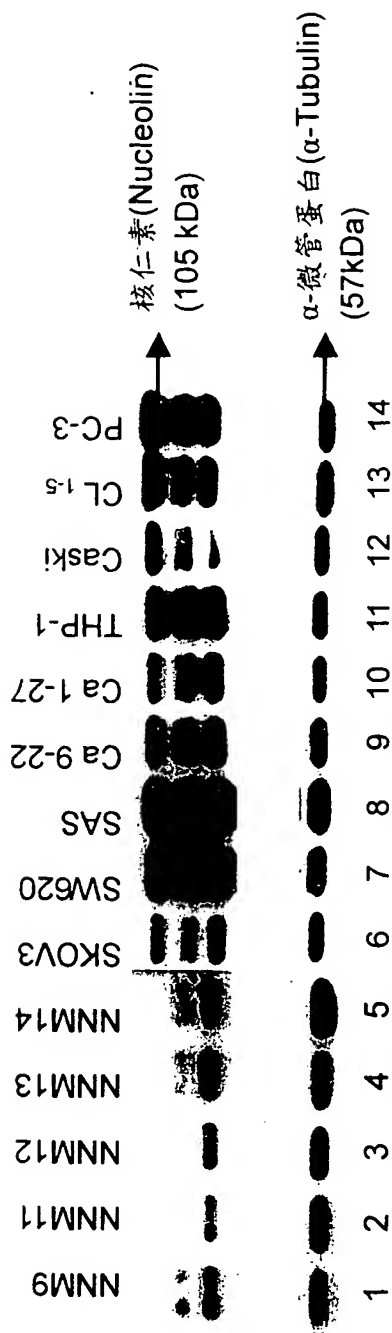
TCACA CTCCG CCGCC ATCAT 20

拾壹、圖式：

(A)



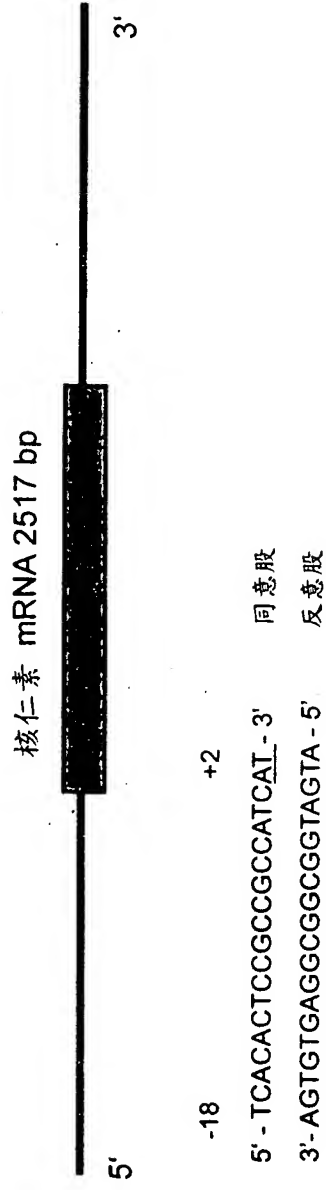
(B)



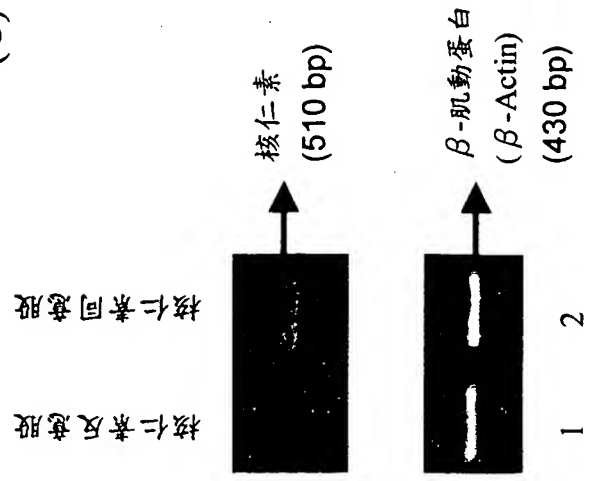
(C)



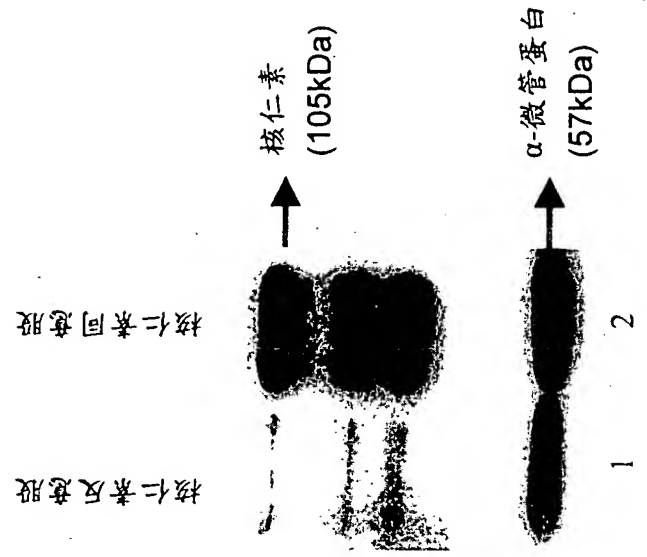
(A)



(B)



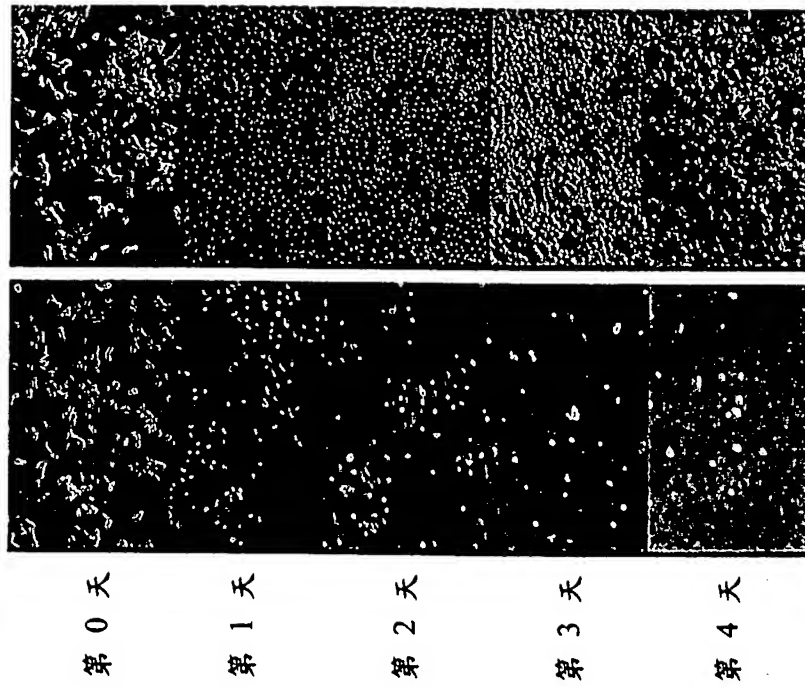
(C)



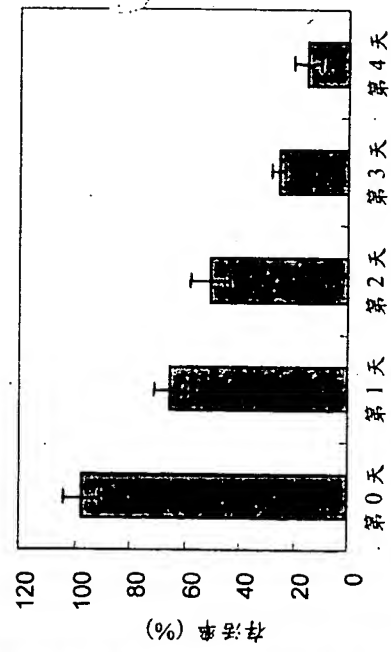
(A)

核仁素反意股

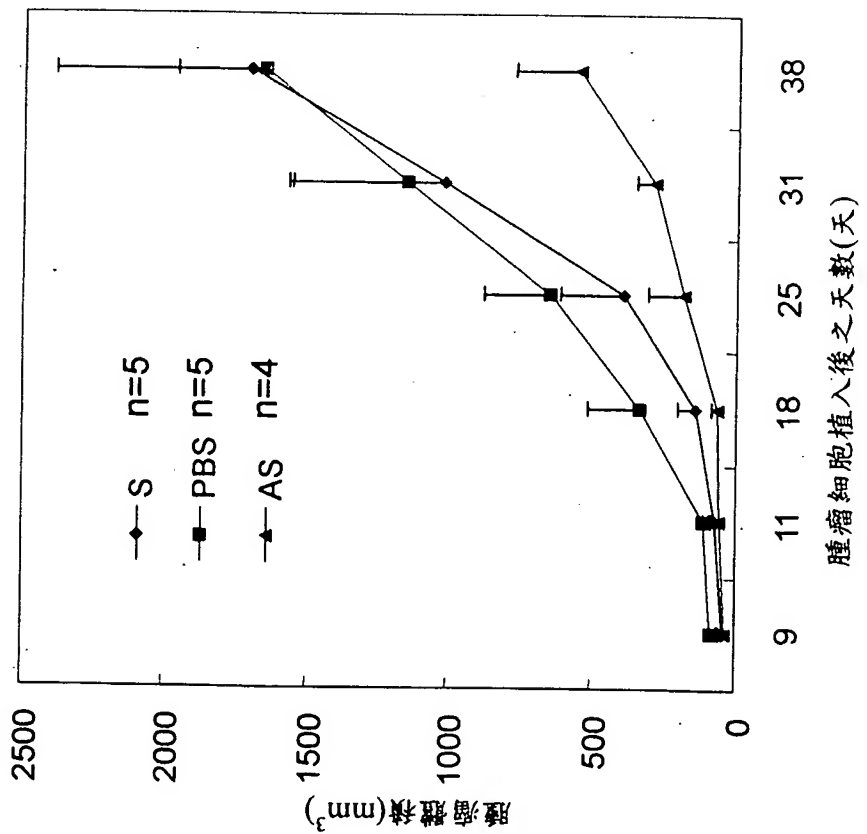
核仁素同意股



(B)



(A)



(B)

